

PCT

WELTOGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation⁵ : C12Q 1/68, C12P 19/34</p>		A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/26928 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. November 1994 (24.11.94)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/00568 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Mai 1994 (17.05.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 43 17 414.0 18. Mai 1993 (18.05.93) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]: Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). BAUER, David [DE/DE]; Uhlandstrasse 56, D-13156 Berlin (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Titel: COMPLEX DIAGNOSTIC AGENT OF GENETIC EXPRESSION AND MEDICAL DIAGNOSIS AND GENE ISOLATION PROCESS USING SAID DIAGNOSTIC AGENT</p> <p>(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR KOMPLEXEN DIAGNOSTIK DER GENEXPRESSION UND VERFAHREN ZUR ANWENDUNG FÜR DIE MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK UND DIE GENISOLIERUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A complex diagnostic agent of genetic expression consists of a set of at least 288 oligonucleotide primer pairs composed of a reserve of at least 24 5'-oligonucleotide primers and at least 12 3'-oligonucleotide primers. The length of the oligonucleotide primers lies between 6 and 13 nucleotides, and preferably equals 10 nucleotides. The sequences of the 5'-oligonucleotide primers preferably have the same number of G+C and A+T. With this agent, at least 288 parallel and independent PCR tests are carried out in a cDNA mixture. After separation in non-denaturing polyacrylamide gels, the line pattern is recorded and compared with the standard of a reference cell. The fragment profiles are preferably automatically recorded by colour marked primers. The invention has applications in molecular biology, in particular for identifying known and unknown expressed genes and for isolating genes, as well as in clinical diagnosis, for example for detecting morbid changes, including cancer.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression. Es besteht aus einem Satz von mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren, welche jeweils aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und mindestens 12 3'-Oligonukleotid-Primern gebildet werden. Die Länge der Oligonukleotid-Primer liegt bei 6-13, bevorzugt 10, Nukleotiden, wobei die Sequenzen der 5'-Oligonukleotid-Primer bevorzugt die gleiche Anzahl von G+C und A+T aufweisen. Mit dem Mittel werden in einem cDNA-Gemisch mindestens 288 parallele und unabhängige PCR-Ansätze durchgeführt. Nach Trennung in nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen wird das Bandenmuster registriert und mit dem Standard einer Referenzzelle verglichen. Dabei wird bevorzugt mit farbmarkierten Primern eine automatische Aufzeichnung der Fragmentprofile vorgenommen. Anwendungsbereiche der Erfindung sind die Molekularbiologie, insbesondere die Identifizierung bekannter und unbekannter exprimierter Gene und die Genisolierung sowie die klinische Diagnostik, z.B. zur Feststellung von krankhaften Veränderungen einschließlich Krebs.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

- 1 -

Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression und Verfahren zur Anwendung für die medizinische Diagnostik und die Genisolierung

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression und ein Verfahren zur Anwendung des Mittels. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekularbiologie, insbesondere die Untersuchung von exprimierten Genen und die Genisolierung sowie die klinische Diagnostik von krankhaften Veränderungen einschließlich Krebs.

Die Analyse des menschlichen Genoms hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Die Ermittlung der Bausteinreihenfolge des gesamten Erbmaterials (Genoms) wird international angestrebt. Damit werden Aussagen über Genstruktur und konkrete genetische Defekte möglich, die zur Personenidentifikation angewendet werden können. Da das Gesamtgenom sehr komplex ist, wird alternativ die Ermittlung der Sequenzen nur der tatsächlich aktiven Gene angestrebt. Dies ist relativ leicht möglich durch das Anlegen einer cDNA-Bibliothek eines bestimmten Zelltyps und die anschließende Sequenzierung aller Einzelklone (PCT-Patent WO 93/353).

Die Polymerase-Ketten-Reaktion oder PCR-Technik hat andererseits die Möglichkeit geschaffen, jedes beliebige DNA-Stück oder Gen zu identifizieren und zu vermehren. Diese Technik lässt sich auf die Identifizierung exprimierter Gene, d.h. den Nachweis der Synthese einer entsprechenden mRNA, anwenden (Rappolee, D.A. et al. Science 241/1988/708). Dabei wird zunächst mRNA mit Hilfe einer Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für die Amplifikation mit bestimmten Primern eingesetzt wird. Diese Technik wird heute bereits für die Diagnostik der Expression bestimmter Gene im Routinelabor eingesetzt. Sie ist aber nur auf bereits bekannte Gene anwendbar, da die Primer aufgrund der bekannten Gensequenz festgelegt und synthetisiert wurden.

- 2 -

Für die molekulare Diagnostik von Veränderungen in der Genexpression, die beispielsweise mit Krankheitsprozessen einhergehen, wäre die Verfügbarkeit einer Technik wünschenswert, die alle, also auch noch unbekannte, Genfunktionen erfassen ließe. Das bedeutet, daß ein Weg gefunden werden muß, um alle mRNA-Spezies auch ohne Kenntnis ihrer Sequenz zu identifizieren. Eine derartige Technik wurde erstmals von Liang und Pardee (Science 257/1992/967) vorgestellt. Sie basiert auf der fraktionierten Herstellung von cDNA mit Primern, die entweder 12 oder 4 Fraktionen entstehen lassen. Diese cDNA-Fraktionen werden anschließend mit mehreren kurzen Primern in unabhängigen Reaktionen amplifiziert. Die Primer sind dabei so kurz (10 Nukleotide), daß ihre Chance relativ groß ist, in vielen cDNA-Spezies Homologien zu finden. Statistisch kann dabei davon ausgegangen werden, daß die Länge der entstehenden Fragmente unterschiedlich groß ist. Wenn einen genügend große Zahl von Primern geeigneter Sequenz eingesetzt wird, sollte es möglich sein, prinzipiell alle exprimierten mRNAs als cDNA-Fragment zu amplifizieren. Die Identifizierung der Fragmente wurde von Liang und Pardee nach radioaktiver Markierung durch Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Sequenzierungsgel durchgeführt. Diese Autoren haben ihre Methode zunächst zur Identifizierung von veränderter Genexpression in Brustkrebszellen eingesetzt (Science 257/1992/967, Cancer Research 52/1992/6966) dabei einige veränderte Banden identifiziert und anschließend die dazugehörigen Gene teilweise isoliert.

Bei der Verwendung der beschriebenen Methodik wird offensichtlich, daß die Identifizierung vieler Fragmente bzw. Banden auf einem Sequenzierungsgel möglich ist und beim Vergleich identischer PCR-Reaktionen von zwei Zelltypen auch viele Unterschiede gefunden werden können. Allerdings konnte festgestellt werden (Bauer et al., Nucleic Acids Research 21, 1993, S. 4272-4280), daß 1/3 bis 2/3 aller Fragmente tatsächlich nicht nur eine Bande, sondern 2-4 Banden produzieren, was mit der Eigenschaft der Taq-Polymerase zusammenhängt, am 3'-Ende der kopierten Stränge noch ein zusätzliches A anzuhangen. Darüberhinaus werden häufig die zwei Stränge eines Fragments aufgrund unterschiedlichen Purin-/Pyrimidin-Gehaltes separiert.

- 3 -

So treten veränderte Banden vielfach als Block von unmittelbar aufeinanderfolgenden Banden auf. Dadurch wird eine Komplexität des Musters vorgetäuscht, die nicht vorhanden ist.

Die von Pardee und Liang angegebenen Primer reichen darüberhinaus keinesfalls aus, um die notwendige Komplexität des Fragmentmusters zu erreichen. Bei einer angenommenen Zahl von ca. 15 000 Genen, die in einer Zelle exprimiert werden, müßten mindestens 30 000 verschiedene Fragmente produziert und sichtbar gemacht werden, um mit großer Wahrscheinlichkeit auch nahezu jede mRNA erfaßt zu haben, wobei eine größere Zahl von Genen zweimal und eine kleinere Zahl dreimal oder häufiger repräsentiert sein müßten. Darüberhinaus wäre es wichtig,, das Diagnose-Verfahren universell anwendbar zu machen. Dafür ist eine Vereinfachung und gleichzeitige Objektivierung der Bandenerfassung notwendig.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Untersuchung der Genexpression zu verbessern bzw. überhaupt erst zu ermöglichen. Ihr liegt die Aufgabe zugrunde, die in Zahl und Sequenz geeigneten Oligonukleotid-Primer auszuwählen,

(2.) ein Elektrophorese-System zu schaffen, das nur eine Bande pro Fragment produziert und

(3.) alles mit einer Nachweismethode zu kombinieren, die eine Automatisierung der Methode zur Diagnostik von Veränderungen der Genexpression in kürzester Zeit ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Mittel ist durch einen Satz von mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren definierter Länge, gebildet durch Auswahl aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und 12 3'-Oligonukleotid-Primern, gekennzeichnet. Diese Oligonukleotid-Primer sind mit einem geeigneten Marker gekoppelt, der durch ein Nachweisverfahren erkannt werden kann.

Die Primer wurden aus einer Liste von 2000 zufälligen, Computer-generierten Sequenzen ausgewählt, 50 ausgewählte Sequenzen wurden experimentell geprüft, 26 davon erwiesen sich als

ERSATZBLATT

- 4 -

geeignet für das erfindungsgemäße Mittel.

Die Länge der Oligonukleotid-Primer beträgt 6-13 Nukleotide, bevorzugt 10 Nukleotide, wobei die Sequenzen der 5'-Primer bevorzugt die gleiche Anzahl G+C und T+A aufweisen. Die 3'-Primer besitzen eine Reihe von T-Nukleotiden, bevorzugt 8-12, und zusätzlich am Ende in ein bis drei Positionen, bevorzugt in 2 Positionen, G-, C-, T- oder A-Nukleotide. Durch Kombination jedes der mindestens 24 5'-Primer mit jedem der (im Falle von 2 spezifischen endständigen Nukleotiden) 12 3'-Primern entstehen die mindestens 288 Kombinationen gemäß der Erfindung.

Alle Primer sind markiert, wobei als Markierung radioaktiver Phosphor, ein Fluoreszenzfarbstoff, Biotin oder ein Antigen verwendet wird.

Bevorzugt eingesetzt werden die 5'-Oligonukleotid-Primer gemäß Anspruch 7. Diese Primer können erfindungsgemäß auch miteinander kombiniert werden, wobei eines der beiden eingesetzten Primer als 3'-Primer fungiert. Bei dieser Möglichkeit erhält man im Erfolgsfalle Teilsequenzen der jeweiligen cDNA, womit eine weitere Identifizierung erreicht wird.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Anwendung des Mittels wird folgendermaßen durchgeführt

1. Die gesamte mRNA einer zu untersuchenden Zelle wird isoliert
2. Umschreibung in cDNA entweder insgesamt oder in mehreren, bevorzugt 12, Fraktionen
3. Nachfolgende Amplifizierung durch mindestens 288 parallele und unabhängige Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) mit dem ausgewählten Mittel. Eine bevorzugte Temperatur für die Durchführung der Reaktion ist 40° C.
4. Auftrennung des entstandenen Fragmentgemischs jeder Reaktion auf einer gesonderten Bahn eines Polyacrylamid-Gels, bevorzugt auf 7 Gelen mit 48 Bahnen. Für den erfindungsgemäßen Erfolg ist wesentlich, daß ein nichtdenaturiertes Gel eingesetzt wird.
5. Ablesung der Bandensignale durch Autoradiographie oder durch nichtradioaktive Nachweise (Fluoreszenzfarbstoffe, Biotin oder ein Antigen) und Vergleich mit dem Muster einer Referenzzelle.

Die PCR-Reaktionen der Referenzzelle werden mit Primern

ERSATZBLATT

- 5 -

durchgeführt, die mit einem anderen Farbstoff markiert sind, als die Primer für die PCR-Reaktionen der zu untersuchenden Zelle. Die mit Primern gleicher Sequenz, aber mit verschiedenen Farbstoffen markierten Fragmente von Referenz- und zu untersuchender Zelle werden gemäß der Erfindung gemeinsam in einer Bahn eines Sequenzautomaten aufgetrennt, wobei die Unterschiede der Genexpression durch ein unterschiedliches Farbsignal in einer bestimmten Position aufgezeigt werden.

Das neue Mittel kann gleichermaßen zur Isolierung von Genen oder Gensequenzen eingesetzt werden. Dabei wird eine Bande, die aufgrund der gefundenen Unterschiede zwischen den untersuchten Zellen als Repräsentant eines differentiell regulierten Gens identifiziert wurde, isoliert und als Sonde zur Gewinnung des entsprechenden Gens einer cDNA-Bank eingesetzt. Dazu wird die Bande mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, in einer PCR-Inkubation mit einem biotinylierten Nukleotid amplifiziert und gleichzeitig markiert und anschließend mit einer denaturierten cDNA-Bibliothek in Lösung hybridisiert. Das resultierende Hybrid wird an magnetische Kugeln, die mit Streptavidin bedeckt sind, gebunden und von unspezifisch gebundenem Material freigeswaschen. Die spezifisch gebundene cDNA wird freigesetzt und zur Transformation von E.coli eingesetzt. Aus diesen wird die Plasmid-DNA isoliert und das cDNA-Insert sequenziert. Durch Vergleich der ermittelten Sequenz mit der Sequenz-Datenbank wird festgestellt, ob es sich um ein bekanntes oder ein noch unbekanntes Gen handelt.

Das neue Mittel und das Verfahren zu seiner Anwendung erlauben die umfassende Darstellung exprimierter Gene in Form von jeweils mindestens einer Bande.

Innerhalb einer Woche kann die Analyse für einen bestimmten Zelltyp abgeschlossen werden, wonach der automatische Vergleich mit dem Muster der exprimierten mRNAs beliebiger anderer Zelltypen durchgeführt werden kann. Für die klinische Diagnostik von krankhaften genetischen Veränderungen z.B. bei Krebs-erkrankungen, wird durch die Erfindung ein erheblicher

- 6 -

Fortschritt erreicht.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden:

ERSATZBLATT

Ausführungsbeispiele

1. Zytoplasmatische RNA der zu untersuchenden Zellen (normale Mausleber und regenerierende Mausleber) wurde in an sich bekannter Weise präpariert. Die RNA wurde anschließend auf 12 Inkubationsansätze verteilt und unter Verwendung der von Liang und Pardee (Science 257) beschriebenen Primer dT₁₁XY einer reversen Transkriptionsreaktion in bekannter Weise unterzogen (dabei stellen X und Y alle Kombinationen der 4 Nukleotide G,A,T,C dar, mit der Ausnahme, daß in der Position X kein T verwendet wird). In jede Reaktion wurden folgende Komponenten pipettiert: 0.1-0.2 µg RNA, 2.5 µM dT₁₁XY Primer, 20 µM dNTP und 300 Einheiten MMLV Reverse Transcriptase. Die Reaktionen wurden bei 35° C für eine Dauer von 60 min inkubiert und durch 5 min Inkubation bei 95° C gestoppt. Die 12 erhaltenen cDNA-Fraktionen wurden dann spezifischen Polymerasekettenreaktionen (PCR) unterzogen:

a) Zunächst wurden aus einer Zahl von 2000 zufälligen, Computer-generierten Sequenzen einer Länge von 8-13 Nukleotiden 50 Kandidaten-Sequenzen ausgewählt, synthetisiert und als Primer für PCR Inkubationen mit jeweils 3 cDNA-Fraktionen eingesetzt. Dazu wurden folgende Reaktionen angesetzt: 2.5 µM dT₁₁XY Primer, 0.5 µM des entsprechenden 5'-Primers, 2 µM dNTPs, 2 µCi (60 nM) ³³P-dATP, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, and 1 U Taq Polymerase in einem Volumen von 20 µl. Die Amplifikation wurde in 40 Zyklen mit 30 Sekunden bei 94° C, 1 Minute bei 42° C und 30 Sekunden bei 72° C durchgeführt. Die Reaktionsgemische wurden getrocknet und anschließend in 5 µl Formamid/Farbstofflösung aufgenommen. 1,5 µl wurden auf 6% Polyacrylamid-Harnstoff-Sequenzgelen aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und der Autoradiographie unterzogen. Die Autoradiogramme wurden mit einem Scanner eingelesen, und die Zahl der Banden wurde ermittelt. Dabei wurde eine Zahl von 26 Primern mit sämtlichst 10 Nukleotiden Länge ermittelt , die mit den drei getesteten cDNA-Fraktionen eine Bandenzahl zwischen 40 und 160 ergaben. Diese Primer wurden als geeignet befunden, ein repräsentatives Bandenmuster aller exprimierten RNA-

ERSATZBLATT

- 8 -

Spezies zu generieren.

b) Es wurde ein Versuchsprotokoll konzipiert, das eine umfassende Darstellung aller exprimierten RNAs in kürzester Zeit und mit geringstem Aufwand erlaubte:

- Es wurden 12 PCR-Inkubationsmixturen vorbereitet, die bis auf den 5'-Primer alle unter a) genannten Komponenten enthielten, und zwar in einem Volumen von 15 µl pro Einzelreaktion und ausreichend für 24 Reaktionen. Dabei enthielt jedes der 12 Röhrchen einen anderen 3'-Primer des Typs dT₁₁XY. Mit einer 12-Kanal-Pipette wurden jeweils 15 µl der 12 Mixturen gleichzeitig in die erste Reihe einer Mikrotiterplatte (bzw. Röhrchen in diesem Format angeordnet) pipettiert. Dieser Schritt wurde 24 Mal für 3 Mikrotiterplatten wiederholt.

- Stammlösungen von 24 verschiedenen 5'-Primern wurden so angeordnet (3x8 Reihen), daß je 5 µl von 8 verschiedenen Primern (Nr. 1-8 aus Tabelle 1) mit einer 8-Kanal-Pipette gleichzeitig in die erste senkrechte Reihe der ersten Mikrotiterplatte pipettiert werden konnten. Dieser Schritt wurde 12 Mal für die 12 senkrechten Reihen der ersten Platte wiederholt. Danach wurden die Primer Nr. 9-16 in die 12 senkrechten Reihen der zweiten Mikrotiterplatte und anschließend die Primer Nr. 17-24 in die 12 senkrechten Reihen der dritten Mikrotiterplatte transferiert. Die 288 Reaktionsansätze wurden durch kurzes Zentrifugieren der Platten gemischt. Dann wurden die drei Platten nacheinander in einem PCR-Gerät mit Mikrotiterformat-Heizblock für 40 Zyklen wie unter a) inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsgemische in einer Vakuumzentrifuge mit Mikrotiterplatten-Rotor bis zur Trocknung zentrifugiert. Danach wurden alle Reaktionsgemische in Formamid aufgenommen und der Elektrophorese wie unter a) unterzogen. Dazu wurden 6 Gele mit je 48 Bahn beschickt. Nach der Trennung wurden die Gele getrocknet und mit einem Scanner eingelesen. Für die cDNAs der normalen Mausleber wurden in den 288 Bahn insgesamt 20160 Banden identifiziert.

- 9 -

c) Der Versuch von b) wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen mit verschiedenen "annealing"-Temperaturen zwischen 34° C und 45° C durchgeführt. Dabei erwies sich 40° C als das Optimum. Es wurden dabei fast doppelt so viel Banden gefunden wie bei 42° C, wobei die Muster ihre Individualität behielten.

d) Zwecks Anwendung der Methode zur Identifizierung von Unterschieden in der Genexpression zwischen zwei unterschiedlichen Zuständen eines Zellsystems wurden die RNAs von normaler Mausleber und regenerierender Mausleber verglichen. Dabei wurde die Prozedur b) mit 40° statt 42° C in gleicher Weise für beide RNAs durchgeführt, d.h. mit zwei Sätzen von je 3 Mikrotiterplatten. Die Elektrophorese wurde in insgesamt 12 Gelen durchgeführt, wobei generell die Proben mit den gleichen Primern aus beiden Ansätzen nebeneinander liefen. Im Ergebnis dieser Analyse wurden mindestens 70 Banden identifiziert, die nur in jeweils einer der beiden Ausgangs-RNAs vorhanden waren. Zahlreiche weitere Unterschiede konnten nur vermutet werden.

e) Die Charakterisierung der unterschiedlichen Banden wurde durch Sequenzierung versucht. Dabei traten Probleme auf, die vor allem durch das Vorliegen von Einzelsträngen sowie das denaturierende Gel (Harnstoff) begründet waren. Daher wurden die Proben nach der PCR-Reaktion in wässriger Lösung auf Polyacrylamidgele ohne Harnstoff aufgetragen, die Banden ausgeschnitten und direkt eine Sequenzierungsreaktion eingebbracht. Dadurch wurde zwar die Bandenzahl auf ca. die Hälfte reduziert, aber die DNA der interessierenden Banden konnte direkt als Scheibe aus dem Polyacrylamidgel in einer Sequenzierungsreaktion inkubiert und die Sequenz ermittelt werden. Die Verwendung nichtdenaturierender Gele hat sich damit als entscheidende Voraussetzung für die Identifizierung der interessanten Gensequenzen erwiesen.
Mit dieser Methode wurde die Gesamtanalyse der exprimierten RNAs in der Mausleber mit allen 26 5'-Primern durchgeführt. Dabei wurden insgesamt ca. 38 000 Banden identifiziert, die sich statistisch auf die Primerpaare verteilen (Tab. 1).

ERSATZBLATT

- 10 -

2. Die Methode sollte zu einer generell einsetzbaren und automatisierten Analytik ausgebaut werden, die ein zweifelsfreies Identifizieren von Unterschieden in der Genexpression zwischen zwei oder auch mehr Zuständen erlaubt, und dies möglichst nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ. Unter 1d) wurde bereits festgestellt, daß das Nebeneinanderlaufen der zu vergleichenden Proben nicht in jedem Falle die eindeutige Identifizierung von Unterschieden ermöglicht. Daher wurde die Methodik auf den automatischen Sequenzanalysator 373A adaptiert, der bis zu vier farbmarkierte Proben in einer Bahn vergleichen kann. Dazu wurden alle 26 5'-Primer mit den vier Farbstoffen TAMRA, ROX, FAM und JOE (entsprechend Protokoll der Fa. Applied Biosystems) markiert. Die jeweils 12 cDNA-Fraktionen von normaler Leber und von drei verschiedenen Zeitpunkten der Regeneration wurden entsprechend Beispiel 1b+c amplifiziert, wobei für jede der 4 Ausgangs-RNAs eine andere Farbmarkierung gewählt wurde. Die Konzentration der markierten 5'-Primer war 0.5 μ M und die dNTP-Konzentration wurde auf 100 μ M erhöht. Die PCR wurde ansonsten wie unter 1b beschrieben durchgeführt. Die Trennung wurde im denaturierenden Gel im 373A durchgeführt, und die Farbmarkierung wurde aufgezeichnet.

ERSATZBLATT

- 11 -

Tabelle 1: Anzahl der Banden im nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel von cDNA-Fraktionen, die durch reverse Transkription von Mausleber-RNA mit den 12 Primern T₁₁VN erhalten wurden. Die 312 PCR-Inkubationen wurden mit den in der Tabelle angegebenen Primer-Paaren durchgeführt. (Die 5'-Primer 1-26 entsprechen den in den Ansprüchen angegebenen Primern 1-26.

T ₁₁	CA	CG	CT	CC	GA	GG	GT	GC	AA	AG	AT	AC	Σ	x
Primer 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	92	188	73	137	186	182	67	189	121	142	129	147	1653	138
2	148	66	131	82	156	150	176	126	103	179	154	125	1596	133
3	81	172	172	121	89	82	135	131	114	97	145	124	1463	122
4	105	126	99	71	118	107	96	130	67	170	124	174	1387	116
5	94	182	104	157	101	91	70	91	115	89	148	103	1345	112
6	125	137	111	95	161	112	98	121	65	64	124	152	1365	114
7	62	93	129	60	169	146	176	64	104	175	123	156	1457	121
8	120	133	93	94	110	158	188	102	151	108	173	60	1490	124
9	183	157	124	148	173	167	180	167	76	146	90	87	1698	142
10	112	118	183	174	101	73	75	104	165	110	136	111	1462	122
11	98	180	174	159	140	139	123	101	147	73	176	138	1648	137
12	111	129	164	81	126	135	133	89	180	96	152	141	1537	128
13	82	139	149	135	124	146	71	73	136	153	86	90	1384	115
14	73	146	180	93	90	134	167	80	160	70	72	126	1391	116
15	174	179	72	105	138	153	83	88	130	130	104	87	1443	120
16	77	109	145	162	67	127	164	135	132	108	104	120	1450	121
17	65	105	135	136	129	170	151	85	130	106	159	178	1549	129
18	121	185	74	134	117	122	100	66	123	72	74	110	1298	108
19	165	73	80	179	114	169	91	134	65	122	75	121	1388	116
20	165	141	84	69	71	170	62	73	87	68	101	135	1226	102
21	80	137	156	120	94	179	66	126	161	131	188	89	1527	127
22	68	127	121	182	115	85	137	166	107	127	108	181	1524	127
23	156	141	131	78	164	183	92	157	123	95	138	84	1542	129
24	165	62	89	163	107	99	144	93	145	123	138	63	1391	116
25	82	185	187	71	114	184	140	103	142	101	116	170	1595	133
26	81	87	96	153	70	106	177	83	81	119	160	77	1290	108
Σ	2885	3497	3152	3159	3144	3569	3167	2877	3130	2974	3297	3149		
x	111	135	121	122	121	137	122	111	120	114	127	121	x =	122

ERSATZBLATT

- 12 -

Patentansprüche

1. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression, gekennzeichnet dadurch, daß es aus mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren besteht, welche jeweils aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und mindestens 12 3'-Oligonukleotid-Primern gebildet werden, die mit einem geeigneten Marker gekoppelt sind, der durch ein Nachweisverfahren erkannt wird.
2. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Länge der Oligonukleotid-Primer 6-13 Nukleotide beträgt.
3. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß die Sequenzen der 5'-Oligonukleotid-Primer eine gleiche Anzahl von G+C und A+T aufweisen.
4. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1 und 2, gekennzeichnet dadurch, daß die 3'-Oligonukleotid-Primer eine Reihe von T-Nukleotiden, bevorzugt 8-12, und zusätzlich am 3'Ende in 1-3 Positionen alle möglichen Kombinationen der 4 Nukleotide aufweisen.
5. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1-4, gekennzeichnet dadurch, daß alle 5'- oder alle 3'-Primer markiert sind.
6. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß als Markierung radioaktiver Phosphor, ein Fluoreszenzfarbstoff, Biotin oder ein Antigen verwendet wird.
7. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1-6, gekennzeichnet dadurch, daß die 5'-Oligonukleotid-Primer folgende Sequenzen aufweisen:

1. 5' T A C A A C G A G G 3'

ERSATZBLATT

- 13 -

2. T G G A T T G G T C
3. C T T T C T A C C C
4. T T T T G G C T C C
5. G G A A C C A A T C
6. A A A C T C C G T C
7. T C G A T A C A G G
8. T G G T A A A G G G
9. T C G G T C A T A G
10. G G T A C T A A G G
11. T A C C T A A G C G
12. C T G C T T G A T G
13. G T T T T C G C A G
14. G A T C A A G T C C
15. G A T C C A G T A C
16. G A T C A C G T A C
17. G A T C T G A C A C
18. G A T C T C A G A C
19. G A T C A T A G C C
20. G A T C A A T C G C
21. G A T C T A A C C G
22. G A T C G C A T T G
23. G A T C T G A C T G
24. G A T C A T G G T C
25. G A T C A T A G C G
26. G A T C T A A G G C

8. Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression nach Anspruch 1 und 7, gekennzeichnet dadurch, daß die 5'-Oligonukleotid-Primer nach Anspruch 7 als 3'-Oligonukleotid-Primer eingesetzt werden.

9. Verfahren zur Anwendung des Mittels nach Anspruch 1-8, gekennzeichnet dadurch, daß die gesamte RNA einer Zelle in cDNA umgeschrieben, diese anschließend mit dem Mittel in einer bestimmten Zahl, bevorzugt 288-360, paralleler und unabhängiger Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR) amplifiziert, das entstehende Fragmentgemisch jeder Reaktion auf einer Bahn eines nichtdenaturierten Polyacrylamid-Gels aufgetrennt, das Bandenmuster registriert und mit einem Standard verglichen wird,

ERSATZBLATT

- 14 -

gegebenenfalls die DNA aus Banden isoliert und als Sonde zur Genisolierung verwendet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß jede PCR-Reaktion, bevorzugt eine Gesamtzahl von 312, auf der entsprechenden Zahl von Polyacrylamidgelen, bevorzugt 7 Gelen mit 48 Bahnen, getrennt, die Bandensignale durch Autoradiographie oder entsprechende nichtradioaktive Nachweise sichtbar gemacht, mit einem Scanner eingelesen und mit dem Muster von einer Referenzzelle verglichen werden.

11. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß sämtliche PCR-Reaktionen der Referenzzelle mit Primern durchgeführt werden, die mit einem bestimmten Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind und alle PCR-Reaktionen der zu untersuchenden Zelle mit Primern durchgeführt werden, die mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind.

12. Verfahren nach Anspruch 9 und 11, gekennzeichnet dadurch, daß jeweils die mit Primern gleicher Sequenz, aber verschiedenen Farbstoffen markierten Fragmente von Referenz- und zu untersuchender Zelle gemeinsam in einer Bahn eines Sequenzautomaten mit eingebautem Farbdetektionssystem aufgetrennt werden und die Unterschiede in der Genexpression durch unterschiedliches Farbsignal in einer bestimmten Position angezeigt werden.

13. Verfahren nach Anspruch 9, gekennzeichnet dadurch, daß eine Bande aus dem Gel ausgeschnitten, ihre DNA durch PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Biotin markiert, anschließend mit einer denaturierten cDNA-Bibliothek hybridisiert und an Streptavidin-Magnetkugeln gebunden wird, und die spezifisch gebundene cDNA nach Waschung der Kugeln, Eluierung, Bakterientransformation und Plasmidpräparation sequenziert und als bekanntes oder unbekanntes Gen identifiziert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 9, 11 und 12, gekennzeichnet dadurch, daß die Anlagerung ("annealing") der Primer in der PCR-Reaktion bei 40° C erfolgt.

ERSATZBLATT

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12Q 1/68, C12P 19/34		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/26928
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. November 1994 (24.11.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE94/00568		(31) Bestimmungstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Mai 1994 (17.05.94)			
(30) Prioritätsdaten: P 43 17 414.0 18. Mai 1993 (18.05.93) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 2. März 1995 (02.03.95)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): STRAUSS, Michael [DE/DE]; Parkstrasse 3, D-13187 Berlin (DE). BAUER, David [DE/DE]; Uhlandstrasse 56, D-13156 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Biotez Berlin-Buch GmbH, Patentstelle, Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).			
(54) Title: COMPLEX DIAGNOSTIC AGENT OF GENETIC EXPRESSION AND MEDICAL DIAGNOSIS AND GENE ISOLATION PROCESS USING SAID DIAGNOSTIC AGENT			
(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR KOMPLEXEN DIAGNOSTIK DER GENEXPRESSION UND VERFAHREN ZUR ANWENDUNG FÜR DIE MEDIZINISCHE DIAGNOSTIK UND DIE GENISOLIERUNG			
(57) Abstract			
<p>A complex diagnostic agent of genetic expression consists of a set of at least 288 oligonucleotide primer pairs composed of a reserve of at least 24 5'-oligonucleotide primers and at least 12 3'-oligonucleotide primers. The length of the oligonucleotide primers lies between 6 and 13 nucleotides, and preferably equals 10 nucleotides. The sequences of the 5'-oligonucleotide primers preferably have the same number of G+C and A+T. With this agent, at least 288 parallel and independent PCR tests are carried out in a cDNA mixture. After separation in non-denaturating polyacrylamide gels, the line pattern is recorded and compared with the standard of a reference cell. The fragment profiles are preferably automatically recorded by colour marked primers. The invention has applications in molecular biology, in particular for identifying known and unknown expressed genes and for isolating genes, as well as in clinical diagnosis, for example for detecting morbid changes, including cancer.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft ein Mittel zur komplexen Diagnostik der Genexpression. Es besteht aus einem Satz von mindestens 288 Oligonukleotid-Primer-Paaren, welche jeweils aus einem Vorrat von mindestens 24 5'-Oligonukleotid-Primern und mindestens 12 3'-Oligonukleotid-Primern gebildet werden. Die Länge der Oligonukleotid-Primer liegt bei 6-13, bevorzugt 10, Nukleotiden, wobei die Sequenzen der 5'-Oligonukleotid-Primer bevorzugt die gleiche Anzahl von G+C und A+T aufweisen. Mit dem Mittel werden in einem cDNA-Gemisch mindestens 288 parallele und unabhängige PCR-Ansätze durchgeführt. Nach Trennung in nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen wird das Bandenmuster registriert und mit dem Standard einer Referenzzelle verglichen. Dabei wird bevorzugt mit farbmarkierten Primern eine automatische Aufzeichnung der Fragmentprofile vorgenommen. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Molekulärbiologie, insbesondere die Identifizierung bekannter und unbekannter exprimierter Gene und die Genisolierung sowie die klinische Diagnostik, z.B. zur Feststellung von krankhaften Veränderungen einschließlich Krebs.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowakenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/00568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 5 C12Q1/68 C12P19/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHEDMinimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 5 C12Q C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SCIENCE, vol.257, 14 August 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 967 - 971</p> <p>P. LIANG AND A.B. PARDEE 'Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction' cited in the application see page 967, middle column, line 1 - page 970, right column, line 39 see page 969, left column, line 10 - line 63</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-5

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

18 January 1995

Date of mailing of the international search report

06.02.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 94/00568

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CANCER REASERCH, vol.52, no.24, 15 December 1992, WARVERLY PRESS INC., BALTIMORE,US; pages 6966 - 6968 P. LIANG ET AL. 'Differential display and cloning of messenger RNA from human breast cancer versus mammary epithelial cells' cited in the application see page 6966, right column, line 1 - line 43 ---	1-5
Y	EP,A,0 531 027 (AMERSHAM INTERNATIONAL) 10 March 1993 see page 3, line 20 - page 5, line 54; claims 1-8 ---	1-5
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol.198, no.1, October 1991, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US; pages 86 - 91 A. LANDGRAF ET AL. 'Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunoabsorbent assay techniques' see page 87, right column, paragraph 2 - page 90, right column, paragraph 3 ---	1-5
A	US,A,5 104 792 (SILVER ET AL.) 14 April 1992 insgesamt ---	1-14
P,Y	WO,A,93 18176 (DANA-FABER CANCER INSTITUTE) 16 September 1993 see page 11, line 5 - line 19 ---	1-5
P,X	NUCL. ACIDS RES., vol.21, no.18, 11 September 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; pages 4272 - 4280 D. BAUER ET AL. 'Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR)' cited in the application insgesamt ---	1-14
P,X	DE,A,43 17 414 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR ÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 21 April 1994 insgesamt ---	1-14
1		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 94/00568

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>BIOTEC, vol.6, no.2, April 1994, BIOTEC, WÜRZBURG, BRD; pages 32 - 35 D. BAUER ET AL. 'Differential display reverse transcription PCR' insgesamt -----</p>	1-14

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 94/00568

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0531027	10-03-93	NONE	
US-A-5104792	14-04-92	NONE	
WO-A-9318176	16-09-93	US-A- 5262311 CA-A- 2102784 EP-A- 0592626	16-11-93 12-09-93 20-04-94
DE-A-4317414	21-04-94	WO-A- 9426928	24-11-94

Form PCT/ISA/218 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 94/00568

A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 C12Q1/68 C12P19/34

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 5 C12Q C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>SCIENCE, Bd.257, 14. August 1992, AAAS, WASHINGTON, DC, US; Seiten 967 - 971 P. LIANG AND A.B. PARDEE 'Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 967, mittlere Spalte, Zeile 1 - Seite 970, rechte Spalte, Zeile 39 siehe Seite 969, linke Spalte, Zeile 10 - Zeile 63</p> <p>----</p> <p>-/-</p>	1-5

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1	Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 18. Januar 1995	Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts 06.02.95
	Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Hornig, H

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 94/00568

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	CANCER REASERCH, Bd.52, Nr.24, 15. Dezember 1992, WARVERLY PRESS INC., BALTIMORE,US; Seiten 6966 - 6968 P. LIANG ET AL. 'Differential display and cloning of messenger RNA from human breast cancer versus mammary epithelial cells' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 6966, rechte Spalte, Zeile 1 - Zeile 43 ---	1-5
Y	EP,A,0 531 027 (AMERSHAM INTERNATIONAL) 10. März 1993 siehe Seite 3, Zeile 20 - Seite 5, Zeile 54; Ansprüche 1-8 ---	1-5
Y	ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Bd.198, Nr.1, Oktober 1991, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US; Seiten 86 - 91 A. LANDGRAF ET AL. 'Direct analysis of polymerase chain reaction products using enzyme-linked immunoabsorbent assay techniques' siehe Seite 87, rechte Spalte, Absatz 2 - Seite 90, rechte Spalte, Absatz 3 ---	1-5
A	US,A,5 104 792 (SILVER ET AL.) 14. April 1992 insgesamt ---	1-14
P,Y	WO,A,93 18176 (DANA-FABER CANCER INSTITUTE) 16. September 1993 siehe Seite 11, Zeile 5 - Zeile 19 ---	1-5
P,X	NUCL. ACIDS RES., Bd.21, Nr.18, 11. September 1993, IRL PRESS, OXFORD, ENGLAND; Seiten 4272 - 4280 D. BAUER ET AL. 'Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR)' in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	1-14
P,X	DE,A,43 17 414 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR ÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 21. April 1994 insgesamt ---	1-14
1		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00568

C(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	<p>BIOTEC, Bd.6, Nr.2, April 1994, BIOTEC, WÜRZBURG, BRD; Seiten 32 - 35 D. BAUER ET AL. 'Differential display reverse transcription PCR' insgesamt</p> <p>-----</p>	1-14

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 94/00568

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0531027	10-03-93	KEINE		
US-A-5104792	14-04-92	KEINE		
WO-A-9318176	16-09-93	US-A- 5262311 CA-A- 2102784 EP-A- 0592626	16-11-93 12-09-93 20-04-94	
DE-A-4317414	21-04-94	WO-A- 9426928		24-11-94

Formblatt PCT/ISA/318 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)